

13T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PF-000006-WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03860	International filing date (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00)	Priority date (day/month/year) 21 June 1999 (21.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/60, 1/26, C12N 9/04		
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of 4 sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 January 2001 (19.01.01)	Date of completion of this report 09 May 2001 (09.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/03860

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages _____ 1-3,5-23 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____ 4,4/1 _____, filed with the letter of _____ 13 April 2001 (13.04.2001)
- ☒ the claims:
 pages _____ 3,6-37 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____ 1,2,4,5 _____, filed with the letter of _____ 13 April 2001 (13.04.2001)
- ☒ the drawings:
 pages _____ 1-3 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/03860

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-37	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-37	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-37	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-37

Document 1 cited in the international search report (JP, 10-14596, A (Toyobo Co., Ltd.), 20 January 1998 (20.01.98)) discloses a method whereby, before measuring cholesterol esters in a bodily fluid, cholesterol which could hinder the measurement is eliminated by the action of cholesterol oxidase; Document 2 cited in the international search report (EP, 676642, A1 (Int. Reagents Corp.), 11 October 1995 (11.10.95)) discloses a method for assaying cholesterol present in specified lipoprotein. However, Documents 1 and 2 do not disclose or suggest the pre-elimination only of free cholesterol as a hindering substance by the action of cholesterol oxidase, and the assay of cholesterol present in specified lipoprotein in samples. Moreover, the inventions described in Claims 1-37 also offer surprising effects which could not be predicted from the disclosures in Documents 1 and 2.

Therefore, the inventions described in Claims 1-37 are novel and involve an inventive step.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/60, C12Q1/26, C12N9/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-C12Q1/60, C12N9/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)
MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 10-14596, A (TOYOBO CO., LTD.), 20 January, 1998 (20.01.98) (Family: none)	1, 3, 4, 6-8, 10, 12-23
Y	EP, 676642, A1 (INT REAGENTS CORP), 11 October, 1995 (11.10.95) & JP, 7-280812, A	1, 3, 4, 6-8, 10, 12-23
A	Journal of Biologocal Chemistry(1995), Vol.270, No.11, pp.5891-5900, Armand J.Mendez, "Monensin and Brefeldin A Inhibit High Density Lipoprotein-mediated Cholesterol Efflux from Cholesterol-enriched Cells"	2, 5, 9, 11, 24-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 September, 2000 (12.09.00)Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



4. 1. 1.

1. 1. 1.

P A T E N T COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ONO, Nobuo
Mitobe Building 4F
1-13-1, Kandaizumi-cho
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 20 October 2000 (20.10.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PF-000006-WO	
International application No. PCT/JP00/03860	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD. et al	International filing date (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00) Priority date (day/month/year) 21 June 1999 (21.06.99)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
21 June 1999 (21.06.99)	11/174624	JP	04 Augu 2000 (04.08.00)
03 Febr 2000 (03.02.00)	2000/26737	JP	04 Augu 2000 (04.08.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Susumu Kubo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/78999
PCT/JP00/03860

PCT

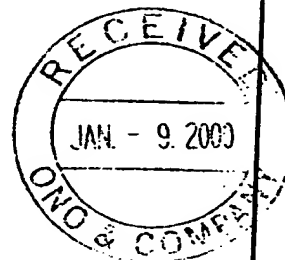
From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

T :

ONO, Nobuo
Mitobe Building 4F
1-13-1, Kandalzumi-cho
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 28 December 2000 (28.12.00)		
Applicant's or agent's file reference PF-000006-WO		
IMPORTANT NOTICE		
International application No. PCT/JP00/03860	International filing date (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00)	Priority date (day/month/year) 21 June 1999 (21.06.99)
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,DZ,KP,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 28 December 2000 (28.12.00) under No. WO 00/78999

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colmbettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
---	---

13 T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PF-000006-WO	FOR FURTHER ACTION SecNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03860	International filing date (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00)	Priority date (day/month/year) 21 June 1999 (21.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/60, 1/26, C12N 9/04		
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- ☒ Basis of the report
- ☐ Priority
- ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Lack of unity of invention
- ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Certain documents cited
- ☐ Certain defects in the international application
- ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 January 2001 (19.01.01)	Date of completion of this report 09 May 2001 (09.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/IP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application N .

PCT/JP00/03860

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-3,5-23, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages 4,4/1, filed with the letter of 13 April 2001 (13.04.2001)
- ☒ the claims:
 pages 3,6-37, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1,2,4,5, filed with the letter of 13 April 2001 (13.04.2001)
- ☒ the drawings:
 pages 1-3, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/03860

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

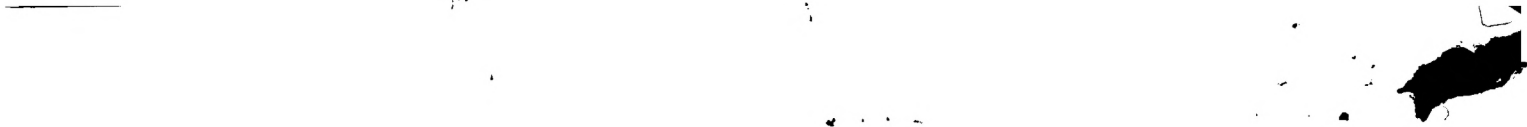
| | | | |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-37 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-37 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-37 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Claims 1-37

Document 1 cited in the international search report (JP, 10-14596, A (Toyobo Co., Ltd.), 20 January 1998 (20.01.98)) discloses a method whereby, before measuring cholesterol esters in a bodily fluid, cholesterol which could hinder the measurement is eliminated by the action of cholesterol oxidase; Document 2 cited in the international search report (EP, 676642, A1 (Int. Reagents Corp.), 11 October 1995 (11.10.95)) discloses a method for assaying cholesterol present in specified lipoprotein. However, Documents 1 and 2 do not disclose or suggest the pre-elimination only of free cholesterol as a hindering substance by the action of cholesterol oxidase, and the assay of cholesterol present in specified lipoprotein in samples. Moreover, the inventions described in Claims 1-37 also offer surprising effects which could not be predicted from the disclosures in Documents 1 and 2.

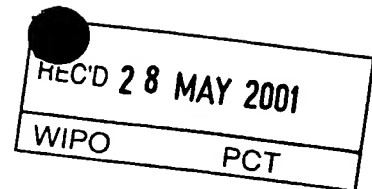
Therefore, the inventions described in Claims 1-37 are novel and involve an inventive step.



P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕



| | | |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 PF-000006
の書類記号 -WO | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/
IPEA/416）を参照すること。 | |
| 国際出願番号
PCT/JPO0/03860 | 国際出願日
(日.月.年) 14.06.00 | 優先日
(日.月.年) 21.06.99 |
| 国際特許分類 (IPC)
Int. Cl. C12Q1/60, C12Q1/26, C12N9/04 | | |
| 出願人 (氏名又は名称)
第一化学薬品株式会社 | | |

| |
|--|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。 |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。

<input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で <u>4</u> ページである。 |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎
II <input type="checkbox"/> 優先権
III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如
V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献
VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備
VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

| | | |
|--|---|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日
19.01.01 | 国際予備審査報告を作成した日
09.05.01 | |
| 名称及びあて先
日本国特許庁 (IPEA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子
電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | 4N 8114 |



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-3, 5-23 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 4, 4/1 ページ、 13.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 3, 6-37 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 2, 4, 5 項、 13.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-3 図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



14-00000-11

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲
請求の範囲

1-37

有
無

進歩性(IS)

請求の範囲
請求の範囲

1-37

有
無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲
請求の範囲

1-37

有
無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-37について

国際調査報告で引用した文献1(JP、10-14596, A(東洋紡績株式会社)20.1月.1998(20.01.98))には、体液中のコレステロールエステルの測定に先立ち、その測定の妨害物質としてのコレステロールを、コレステロールオキシダーゼを作用させて消去する方法が記載されており、同文献2(EP、676642, A1(INT REAGENTS CORP)11.10月.1995(11.10.95))には、特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールの定量法が記載されている。しかしながら、上記文献1, 2には、請求の範囲1-37の発明の技術的特徴である、妨害物質である遊離コレステロールのみを予めコレステロールオキシダーゼを作用させて消去しておく、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールの定量法については、記載も示唆もない。一方、請求の範囲1-37に係る発明においては、上記文献1, 2の記載から予測できない程の格別な効果が奏せられるものと認められる。

したがって、請求の範囲1-37の発明は、新規性と進歩性を有する。



.

とであり、その解決も求められていた。

従って、本発明は基本的にポリアニオン等を必須とせず、簡便な操作で正確に、かつ効率よく特定画分中のコレステロールを定量する事ができ、種々の自動分析装置に好適に使用される方法を提供することを課題とする。

発 明 の 開 示

本発明者等は、前記「生物試料分析」中で報告された、HDL等の特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用した特定画分中のコレステロールの定量値が沈殿法の値より高くでる原因について追求していたところ、測定されるべきでないHDL画分以外のリポ蛋白（LDL、VLDL等）からも表面ないしその極近傍に存在する少量の遊離型コレステロールが引き出され、これが正誤差を生じる原因であるとの結論を得た。そして、この知見に基づき、リポ蛋白が実質的に変化しない条件で遊離型コレステロールのみを予め消費してからコレステロール値を測定すれば、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用した定量法の値と沈殿法での値が一致することを見だし、本発明を完成した。

すなわち本発明は、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白が実質的に変化しない条件で遊離型コレステロールのみを予め消費するために、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法を提供するものである。

また本発明は、リポ蛋白を含む試料に、リポ蛋白が実質的に変化しない条件で遊離型コレステロールのみを予め消費するために、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させた後、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白コレステロール定量法を提供するものである。

図面の簡単な説明



-4/1-

図1は、実施例1における本発明と沈殿法の相関関係を示す図面であり、図2は実施例2における本発明と沈殿法の相関関係を示す図面である。

図3は、実施例5における反応促進物質の効果を示す図面である。



請 求 の 範 囲

1.(補正後)試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白が実質的に変化しない条件で遊離型コレステロールのみを予め消費するために、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法。

2.(補正後)試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白が実質的に変化しない条件で遊離型コレステロールのみを予め消費するために、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素と、フルフェナム酸、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法。

3. 遊離型コレステロールを基質とする酵素が、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項第1項または第2項記載の前処理方法。

4.(補正後)遊離型コレステロールのみを消費するために、リポ蛋白が実質的に変化しない条件でリポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させた後、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法。

5.(補正後)遊離型コレステロールのみを消費するために、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素並びにフルフェナム酸、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質を作用させた後、特定のリポ

-24/1-

蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法。

6. 遊離型コレステロールを基質とする酵素が、コレステロールオキシダーゼ

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年12 月28 日 (28.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/78999 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/60, 1/26, C12N 9/04 (74) 代理人: 小野信夫(ONO, Nobuo); 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町1-13-1 水戸部ビル4階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03860
- (22) 国際出願日: 2000 年6 月14 日 (14.06.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/174624 1999 年6 月21 日 (21.06.1999) JP
特願2000/26737 2000 年2 月3 日 (03.02.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村光浩 (NAKA-MURA, Mitsuhiro) [JP/JP]. 谷口由利子 (TANIGUCHI, Yuriko) [JP/JP]. 真鍋満久 (MANABE, Mitsuhiro) [JP/JP]. 山本光章 (YAMAMOTO, Mitsuaki) [JP/JP]; 〒301-0852 茨城県竜ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 Ibaraki (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PRETREATMENT OF SAMPLE FOR QUANTITATING CHOLESTEROL AND METHOD FOR QUANTITATING CHOLESTEROL IN SPECIFIC LIPOPROTEINS BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: コレステロール定量用試料の前処理方法およびこれを利用する特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法

(57) Abstract: A method of a pretreatment of a sample for quantitating cholesterol characterized by, before measuring cholesterol contained in specific lipoproteins, treating the sample containing lipoproteins with an enzyme, the substrate of which is free cholesterol, optionally together with a reaction accelerator; a method for quantitating cholesterol in specific lipoproteins by using the above method; and a kit for quantitating cholesterol in specific lipoproteins to be used in the above quantification method. By using this quantification method, cholesterol in a specific fraction can be conveniently, accurately and efficiently quantitated fundamentally without resort to polyanion, etc. Thus, this method is appropriately usable in various automatic analyzers.

[続葉有]

WO 00/78999 A1



(57) 要約:

試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素および必要により反応促進物質を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法およびこれを利用する特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法並びにこの定量法に用いられる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キットが開示されている。

この定量法によれば、基本的にポリアニオン等を必須とせず、簡便な操作で正確に、かつ効率よく特定画分中のコレステロールを定量する事ができ、種々の自動分析装置に好適である。

明 細 書

コレステロール定量用試料の前処理方法およびこれを利用
する特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法

5

技 術 分 野

本発明は、少ない試料で簡便な操作により、正確に、効率良く特定画分に存在するコレステロールを分離定量するための前処理方法およびこれを用いる特定画分中のコレステロール測定方法に関する。

1 0

背 景 技 術

コレステロール等の脂質は、血中においてアポ蛋白と共にリポ蛋白質を形成している。このリポ蛋白質は物理的な性状の違いにより、カイロミクロン、超低比重リポ蛋白（VLDL）、低比重リポ蛋白（LDL）、高比重リポ蛋白（HDL）等に分類される。これらのリポ蛋白のうち、LDLは動脈硬化を引き起こす原因物質の一つであり、一方、HDLは抗動脈硬化作用を示す事が知られている。

1 5

すなわち、疫学的にいえば、LDL中のコレステロール値は、動脈硬化性疾患の発症頻度と正相関を示し、一方、HDL中のコレステロール値は動脈硬化性疾患の発症頻度と逆相関を示す事が知られている。従って、今日では、虚血性心疾患の予防や診断を目的としてLDL中やHDL中のコレステロールの測定が広く行われている。

2 0

このLDLやHDL中のコレステロールの測定法としては、たとえば超遠心分離によってLDLやHDLを、他のリポ蛋白と分離した後、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その発色強度を測定する方法が知られている。しかしながら、これらの方法は、いずれも、操作が煩雑であったり、多数の検体を処理できないなどの問題があり、日常的にほとんど用いられていない。

2 5

現在、HDL中のコレステロールの測定方法として、臨床検査の領域で用いら

5 れている方法には、検体に沈澱剤を加えてHDL以外のリポ蛋白を凝集させ、これを遠心分離によって取り除き、分離されたHDLのみを含む上清中のコレステロールを測定する沈澱法がある。この方法は、超遠心法や電気泳動法に比較して簡便であるものの、沈澱剤を加えて分離する操作を含むために、比較的多量の検体量を要し、また、分析誤差を生じる可能性も高く、全分析工程を完全に自動化する事はできなかった。

1 0 一方、酵素的にHDL中のコレステロールを分別定量する方法も検討されている。たとえば、胆汁酸塩及び非イオン系界面活性剤の存在下に、酵素反応を行う方法（特開昭63-126498号）が知られている。この方法は、反応初期の酵素反応はLDL中のコレステロール濃度に比例し、その後の反応速度はHDL中のコレステロール濃度に比例する事を利用したものであるが、HDL中のコレステロールと他のリポ蛋白中のコレステロールの反応を完全に分別する事はできず、正確性に問題があった。

1 5 また、HDL以外のリポ蛋白をあらかじめ凝集させておき、HDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させると同時に凝集を再溶解して吸光度を測定するという方法（特開平6-242110号）が知られている。しかしながら、この方法は少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であるため、限定された自動分析装置にしか適用できず、汎用性の点で問題があった。また、沈澱の再溶解に際しては、高濃度の塩を使う等、分析器機に対するダメージや試薬廃棄の点でも満足できるものではなかった。

2 0 更に第一反応中に、特殊な界面活性剤の存在下でコレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼをHDL以外のリポ蛋白に作用させ、これらに含まれるコレステロールを優先的に作用させたのち、HDL以外のコレステロールに対する反応を抑制しながらHDL中のコレステロールを測定する方法（特開平9-299号）も知られているが、第一反応中でHDL以外のリポ蛋白の遊離型及びエステル型コレステロールの両方を反応系外に導くための特殊な界面活性剤とコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼを同時に必要とする点などで本発明と大きく異なっている。

更にまた、特許第2600065号では、HDL以外のリポ蛋白を沈澱させる

5 沈殿試薬とコレステロール測定試薬を組み合わせ使用し、沈殿しないHDL中のコレステロール(HDL-C)を測定する方法が開示されるが、実際には修飾した酵素と硫酸化 α -シクロデキストリンを沈殿剤として用いる場合に実施可能性のある方法であり、また沈殿剤の効果によって生じる濁りが測定系に妨害を与えてしまうなど、精度の点でも問題のある測定法であった。

1 0 上記の特許方法についての論文発表とされる「生物試料分析」、第19巻、第5号の第305頁から第320頁では、修飾酵素によるHDL-Cの測定について、修飾酵素を反応系に導入するだけではプラス誤差を与える(沈殿法に比べ、高い値が出る)ため、高脂血症患者血清中のHDL-Cは測定できないことを認めた上で、これをさけるためにポリアニオンの1種である硫酸化シクロデキストリンと塩化マグネシウムを沈殿剤として用い、HDL-Cを測定したことを報告している。

1 5 上記特許方法の沈殿剤によって生ずる濁りの影響を軽減するために界面活性剤を共存させる(特開平8-116996号)技術や、抗体を使用する(特開平9-96637号)、糖化合物を使用する(特開平7-301636号)等の技術もあるが、これらはいずれも凝集生成を引き起こす試薬が含まれることを条件とするものであり、基本的にポリアニオン等の沈殿剤の使用はさけられないものであった。

2 0 最近本発明者らは、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用することにより、沈殿剤を使用しなくても特定画分中のコレステロールを正確に定量しうることを見だし、特許出願した(特願平9-244821号)。この方法は、従来の沈殿法とは極めて相関性が高いものであるが、沈殿法との測定値の関係では、上記「生物試料分析」で報告されたのと同様な傾向が認められており、医療機関などで従来の沈殿法と継続したデータを得るために、ポリアニオン等が添加されていた。

2 5 しかしながら、ポリアニオン等を加え、測定系中に沈殿を生じさせることは、セルの汚れ等の問題や、測定値のばらつきの関係から望ましいものでなく、系からの沈殿物の追放が強く求められていた。更に、測定原理上は不必要なポリアニオン等を、データを一致させるためだけに用いることは経済的にも不合理なこ

とであり、その解決も求められていた。

従って、本発明は基本的にポリアニオン等を必須とせず、簡便な操作で正確に、かつ効率よく特定画分中のコレステロールを定量する事ができ、種々の自動分析装置に好適に使用される方法を提供することを課題とする。

5

発 明 の 開 示

本発明者等は、前記「生物試料分析」中で報告された、HDL等の特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用した特定画分中のコレステロールの定量値が沈殿法の値より高くでる原因について追求していたところ、測定されるべきでないHDL画分以外のリポ蛋白（LDL、VLDL等）からも表面ないしその極近傍に存在する少量の遊離型コレステロールが引き出され、これが正誤差を生じる原因であるとの結論を得た。そして、この知見に基づき、リポ蛋白が実質的に変化しない条件で遊離型コレステロールのみを予め消費してからコレステロール値を測定すれば、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用した定量法の値と沈殿法での値が一致することを見だし、本発明を完成した。

すなわち本発明は、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法を提供するものである。

また本発明は、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させた後、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白コレステロール定量法を提供するものである。

2 5 図面の簡単な説明

図1は、実施例1における本発明と沈殿法の相関関係を示す図面であり、図2は実施例2における本発明と沈殿法の相関関係を示す図面である。

図3は、実施例5における反応促進物質の効果を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

本発明においては、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、まず前処理として試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させ、遊離型コレステロールを消費する。

- 5 遊離型コレステロールを基質とする酵素としては、例えばコレステロールデヒドロナゲーゼ、コレステロールオキシダーゼなど遊離型コレステロールを基質とするものならばいずれでも差し支えない。これらは、微生物由来、動物由来、植物由来など、いずれでも、また遺伝子操作により作られたものでも良い。また化学修飾の有無も問わない。上記酵素は、一般的には0.001単位～100単位
- 10 /mlで、好ましくは0.1単位～100単位/mlで使用される。

- 15 試料に上記遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させるための条件は、特に制約はなく、当該酵素について推奨される条件でよい。しかしながら、試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させる段階において、エステル型コレステロールを遊離型コレステロールに変換する反応が生じないように注意する必要がある。すなわち、コレステロールエステラーゼの有無は問題ではないが、これを実質的に作用せしめない条件を維持する必要がある。

- 20 前記の遊離型コレステロールを基質とする酵素は必要に応じて、補酵素を使用することができ、補酵素としてはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドなどが使用できる。これらの酵素は、単独で、或いは2種以上を組み合わせる事ができ、またその使用量は酵素によって異なり、特に制限されるものではないが0.001単位～100単位/mlで、好ましくは0.1単位～100単位/mlで使用される。

- 25 本発明において使用される遊離型コレステロールを基質とする酵素は、前記のようにその由来についての制約はなく、濃度などは所望の性能、操作性を満たすように適宜選択できる。従って、例えば一定の時間内に前処理を完了させるためには、酵素を増量すれば良いし、逆に、酵素を節約したいなら、前処理時間を延長すれば良い。

しかしながら、自動分析機での測定を前提とした検査薬の場合には、両方を同時に満たすことが要望される。すなわち、少量の酵素の利用で短時間に前処理を

完了させることが求められる場合である。このような場合、以下の群から選ばれた反応促進物質を共存させることで、遊離型コレステロールを基質とする酵素を使用する前処理において、前処理の時間を延長することなく、酵素量を低減し、所望の性能を得ることが可能である。

- 5 上記の目的のために利用される反応促進物質としては、例えば、フルフェナム酸、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシン、メビノリン等（反応促進物質の塩あるいは反応促進物質の金属誘導体（アルミニウム誘導体等）が存在するものはそれらも同様）が挙げられる。このうち、フルフェナム酸およびメフェナム酸は、非ステロイド系抗炎症剤、フシジン酸およびモネンシンは抗生物質として知られている物質である。

これら化合物の反応促進物質としての使用に当たっては、それぞれの物性や、測定系のpH、イオン強度、混在物の種類、濃度などを考慮し、濃度等を適宜選択することが必要である。

- 1 5 反応促進剤の使用濃度は、測定系の条件に合わせ実験的に決めることが可能であるが、一般的には、フルフェナム酸の場合は、0.01~100mM程度、フシジン酸の場合は、0.01~10mM程度、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、酢酸ベータメタゾンの場合は、0.01~5mM程度、モネンシン、メビノリンの場合は、0.01~1mM程度、チグリン酸の場合は、1~500mM程度で使用すればよい。

- 2 0 上記の反応促進剤を利用することにより、遊離型コレステロールを基質とする酵素の使用量を数分の一ないし数十分の一にすることが可能となる。また、同じ酵素量で反応時間を短縮することも可能となる。

- 2 5 上記の遊離型コレステロールを基質とする酵素（および必要な場合は反応促進剤）による前処理においては、更に測定の特異性を損なわず酵素の作用を調整する目的で、また、特定のリポ蛋白の凝集を生じない範囲で、他の酵素（リポ蛋白に実質的に影響を与えるものを除く）や塩、pH調整のための緩衝剤、界面活性剤（リポ蛋白に実質的に影響を与えるものを除く）、防腐剤、アルブミンなどの蛋白質類、抗体、抗生物質、サポニン、レクチン、ポリアニオンなど特定のリポ

蛋白に親和性を有する試薬を使用することもできる。

従って、本発明において、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するための前処理剤として、次のような構成成分を含んだものを利用することができる。

5 (必須成分)

例えばコレステロールデヒドロナーゼ、コレステロールオキシダーゼなどの遊離型コレステロールを基質とする酵素。

(任意成分)

1 0 例えば、フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシン、メビノリン等の反応促進物質。

(その他成分)

1 5 例えばNAD等の補酵素、パーオキシダーゼ、カタラーゼ、ジアホラーゼ、アスコルビン酸酸化酵素などの他の酵素、ピルビン酸などの酸、塩、pH調整のための緩衝剤、リポ蛋白に実質的に影響を与えない界面活性剤、防腐剤、アルブミンなどの蛋白質類、抗体、抗生物質、サポニン、レクチン、ポリアニオン、4-アミノアンチピリン等のカップラー、トリンダー試薬等の水素供与体など酸化系発色試薬類、フェナジンメトサルフェート等の電子受容体類、ニトロブルーテトラゾリウム等の還元系発色試薬類。

2 0 本発明においては、上記前処理によりリポ蛋白中の遊離型コレステロールを消費させた後、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定する。

2 5 試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定する方法としては、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して当該リポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することができる方法であれば何れの方法をも利用することができる。

その方法の一例としては、例えば、特開平11-56395号に開示のポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤を特定のリポ蛋白のみに作用する物質とし、その存在下、コレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポ蛋

白のうち、高比重リポ蛋白中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定する方法が挙げられる。

- 5 このうち前者のポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテルの市販品の例としてはエマルゲン A-60（花王社製）などが、後者のポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルの市販品の例としてはエマルゲン B 66（花王社製）等があげられる。

- 1 0 更に、別の方法としては、生物試料分析、第 19 巻、第 5 号の第 305 頁から第 320 頁に開示の修飾酵素を、特定のリポ蛋白のみに作用する物質として用いる方法が挙げられる。この文献の方法では、HDL 以外のリポ蛋白画分の反応を抑制するために硫酸化 α -シクロデキストリンと塩化マグネシウムを用いているが、本発明の前処理方法を利用すればこれらを使用する必要はなくなる。

- 1 5 特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定する方法は、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用する以外は、通常のコレステロールの測定方法に用いる試薬により実施することができる。用いられる試薬に含まれる成分としては、例えば、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ、パーオキシダーゼなどの酵素類、発色剤、補酵素、電子受容体、蛋白質（アルブミン等）、
2 0 防腐剤、界面活性剤、塩、酸、pH 調整のための緩衝剤等が挙げられる。

- 上記成分のうち、界面活性剤としては、イオン性、非イオン性のいずれのものも使用することができ、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、胆汁酸類等が挙げられる。この界面活性剤の使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものではないが 0.0001%～5%で、好ましくは
2 5 0.001%～5%で使用される。

また、緩衝剤としては、特に制約なく、グッドの緩衝剤、りん酸、トリス、フタル酸塩など一般的なものを使用できる。また、その使用量も特に制限させるも

のではないが0.005 M～2 M、好ましくは0.01～1 Mで使用される。

5 本発明により特定のリポ蛋白画分中のコレステロールを定量する方法は、典型的には、まず測定試料中に遊離型コレステロールのみに作用する前処理剤を添加作用させた後に、特定のリポ蛋白のみに作用する物質と通常のコレステロールの測定方法に用いる試薬を含むコレステロール定量試薬（以下、「定量試薬」という）を添加混合して特定リポ蛋白画分中のコレステロール量を測定する方法である。

1 0 その具体的な例としては、検体にコレステロールデヒドロゲナーゼと補酵素（NAD）を混和し、ついでコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼなどを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法、検体にコレステロールデヒドロゲナーゼとNADを混和し、ついでコレステロールエステラーゼなどを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法、検体とコレステロールオキシダーゼをパーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンあるいはカタラーゼなどと共に混合したのちコレステロールエステラーゼなどを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法、検体とコレステロールオキシダーゼをパーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンなどと共に混合したのちコレステロールエステラーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、NADなどを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法などを挙げることができるが、これに限定されるものではない。

2 0 特定のリポ蛋白画分中のコレステロールを測定する方法としては、公知の酵素的測定法のいずれも用いる事ができるが、例えば酵素試薬としてコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを組み合わせて用いる方法、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼを組み合わせて用いる方法等が挙げられる。

2 5 本発明においては、前処理反応である第一反応に使用される酵素と、定量方法である第二反応のコレステロール測定に使用される酵素は、同一でもまた異なっても差し支えない。また第一反応において、過剰量の酵素を使用しこれを第二反応に使用しても差し支えない。要は、リポ蛋白表面に存在する少量の遊離型コレステロールを消費し（第一反応／前処理反応）、次いで測定すべき特定のリ

ポ蛋白のみに酵素が作用する状態として当該リポ蛋白を構成する大部分のコレステロール（遊離型コレステロール+エステル型コレステロール）を定量できるようにすればよいのである。

- 5 また、これらのコレステロール測定用酵素試薬を添加した後、最終的にコレステロールを検出する方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体や、ジアホラーゼあるいは電子受容体と還元系発色試薬をさらに組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法なども利用することができる。補酵素は補酵素サイクリング系により増幅しても良い。

- 1 0 本発明方法を容易に実施するためには、これに適した特定のリポ蛋白中のコレステロールを測定するための定量用キットを用いることが好ましい。

このようなキットは、上での説明に基づき容易に設計することができるが、その例を、遊離型コレステロールを基質とする酵素の代表としてコレステロールオキシダーゼを用いる場合と、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合に分けて示せば次の通りである。

- 1 5 [コレステロールオキシダーゼの場合のキット]

(イ) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質（場合によって更に反応促進物質）を含む第 1 試薬、

- 2 0 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ロ) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび過酸化水素消費物質（場合によって更に反応促進物質）を含む第 1 試薬、

- 2 5 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質および発色剤を含む第 2 試薬
よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ハ) 次の試薬 (1)、(2) および (3)

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質（場合によって更に反応促進物質）を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第3試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

5 上記キットにおいて、過酸化水素消費物質とは、コレステロールオキシダーゼとコレステロールの反応により生じる過酸化水素を消費し、消失させる物質をいい、その例としては、カタラーゼ、4-アミノアンチピリン等のカップラー、トリリンダー試薬等の水素供与体を含む酸化還元系発色試薬などが挙げられる。

このうち、4-アミノアンチピリン等のカップラーおよびトリリンダー試薬等の水素供与体はこれらを組み合わせ、過酸化水素と反応させることにより発色する
1 0 ものであり、上記の(2)または(3)の発色剤として用いられるものである。しかし、本発明の前処理工程で用いる試薬(1)としては、カップラーまたは水素供与体の一方のみを用い、非発色反応で過酸化水素を消費させることが好ましい。もちろん、発色反応させ、測定値の方で調整することも可能である(試薬(1)での発色値を、試薬(2)または試薬(3)の発色値から差し引くことにより調整
1 5 できる)。

[コレステロールデヒドロゲナーゼの場合のキット]

(二) 次の試薬(1)および(2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素(場合によって更に反応促進物質)を含む第1試薬、

2 0 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ホ) 次の試薬(1)および(2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素(場合によって更に反応促進物質)を含む第1試薬、
2 5

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ヘ) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼ (場合によって更に反応促進物質) を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬

5 よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ト) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼ (場合によって更に反応促進物質) を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第 2 試薬

1 0 よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(チ) 次の試薬 (1)、(2) および (3)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素 (場合によって更に反応促進物質) を含む第 1 試薬、

1 5 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬、

(3) コレステロールエステラーゼを含む第 3 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(リ) 次の試薬 (1)、(2) および (3)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素 (場合によって更に反応促進物質) を含む第 1 試薬、

2 0 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬、

(3) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第 3 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

2 5 (ヌ) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質 (場合によって更に反応促進物質) を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ル) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質 (場合によって更に反応促進物質) を含む第 1 試薬、

5 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

上記のコレステロールデヒドロゲナーゼを用いるキットにおいて、補酵素反応生成物消費物質とは、コレステロール、コレステロールデヒドロゲナーゼおよび
1 0 補酵素 (例えば NAD) の反応により生じる還元型補酵素 (例えば NADH) を再び元の補酵素に戻す物質をいい、その例としては、乳酸脱水素酵素とピルビン酸 (基質) の例が挙げられる。上記のキットでは、いずれも試薬 (1) の添加により補酵素の反応生成物が生じるが、このうち、(ニ)、(ヘ)、(チ) および (ヌ) において、反応生成物を消費せずに、そのまま、測定段階において試薬 (1) 添加による発色と同じ波長の光を測定する場合には、試薬 (2) または試薬 (3) による発色値から、試薬 (1) を添加した前処理の段階での発色値を差し引くことにより、特定のリポ蛋白中のコレステロールを定量することができる。また試薬 (1) に、予め反応生成物を消費する物質を添加しておき、これを消費してから試薬 (2) または試薬 (3) を添加して発色させてもよい。この際、試薬 (2) または試薬 (3) には、反応生成物を消費する物質の作用を減じる物質を配合した方がよい。一方、キット (ホ)、(ト)、(リ) および (ル) では、前処理の発色とは別の波長の発色を測定することになるので、必ずしも測定値から前処理の発色値を差し引かなくてもよい。

2 0
2 5 なお、前述したフルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシン、メビノリン等の反応促進物質の用途は、本発明の前処理方法 (剤) およびこれを利用する本発明の特定のリポ蛋白中のコレステロールの定量方法 (キット) に限定されるものではない。

遊離型コレステロールを基質とする酵素を使用するコレステロールの定量方

- 法、例えば、コレステロールオキシダーゼ、パーオキシダーゼ、発色剤等を使用して組み立てられる遊離型コレステロールの定量方法あるいはコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼ、発色剤等を使用して組み立てられる総コレステロールの定量方法にフルフェナム酸等の反応促進物質を共存させれば、遊離型コレステロールを基質とする酵素（ここではコレステロールオキシダーゼ）の使用量を低減すること、酵素反応の反応時間の短縮等の効果を得ることが当然に可能である。

- そして、コレステロール定量方法に関する本明細書等の記載（例えば、界面活性剤を選択して特定のリポ蛋白を測定対象にすること等）を参照すれば、より具体的に所望の定量方法を組み立てられる。

産業上の利用可能性

- 本発明によれば、遠心分離などの機械的前処理はもちろん、ポリアニオン等を用いることなく、簡便な操作で効率良く特定画分中のコレステロールを定量することが可能となる。そして、ポリアニオン等での沈殿を生じることがないので、測定装置（特にセル）等が汚れることがなく、また、測定値のばらつきも生じないので、従来のコレステロール測定方法に比べ優れたものである。

- また、後記実施例に示すように、中性脂肪レベルが高い検体についても従来の沈殿法と相関の高い測定値が得られるものであり、試料を選ばない点でも優れたものである。

- 更に、反応促進剤を使用した場合は、前処理での遊離型コレステロールを基質とする酵素の使用量を少なくすることが可能となる。

- このように、本発明方法は少ない試料で、簡便な操作により、広い範囲の試料について正確で、かつ特異的な測定が可能であるため、種々の自動分析装置に適用でき、臨床検査の領域に置いても極めて有用である。

実施例

- 次に、実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに何ら制約されるものではない。

実施例 1

下記に示す本発明法および沈殿法により、リポ蛋白を含む30例の血清検体について、下記のようにHDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。

(本発明法)

検体3 μ lに、0.1単位/mlのコレステロールデヒドロゲナーゼ（天野製薬製）、2.5mMのNADおよび4-アミノアンチピリン0.03%を含む10mMのりん酸緩衝液（第1試薬；pH8.5）300 μ lを添加した（前処理）。
約5分後、エマルゲンB-66 1%、コレステロールエステラーゼ（旭化成）1.3単位/ml、コレステロールオキシダーゼ（旭化成）2単位/ml、パーオキシダーゼ（東洋紡）5単位/ml及びジスルホブチルメタトルイジン0.04%を含む100mMのMES緩衝液（pH6）からなるコレステロール測定試薬（第2試薬）100 μ lを加えた。

第2試薬添加直前と添加後5分後の600nmにおける吸光度を測定し、その差より血清検体中のHDLコレステロール濃度を求めた（2ポイント法）。また、校正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

(沈殿法)

HDL C2「第一」分画試薬（第一化学薬品株式会社製）200 μ lを検体200 μ lと混和し、3000rpmで10分間遠心分離を行った。この上清50 μ lを採取し、Triton X-100 1%、コレステロールエステラーゼ1単位/ml、コレステロールオキシダーゼ1単位/ml、パーオキシダーゼ5単位/ml及びジスルホブチルメタトルイジン0.04%、4-アミノアンチピリン0.04%を含む100mMのMES緩衝液（pH6.5）からなるコレステロール測定試薬3mlと混合し、37℃で10分間インキュベートした後、600nmにおける吸光度を測定し、HDL中のコレステロール濃度を求めた。

(結果)

結果を表1および図1に示す。

表 1

| 検体番号 | 沈 殿 法
(mg/dl) | 本発明法
(mg/dl) | 検体番号 | 沈 殿 法
(mg/dl) | 本発明法
(mg/dl) |
|------|------------------|-----------------|------|------------------|-----------------|
| 1 | 7 3 | 7 2 | 1 6 | 5 4 | 5 4 |
| 2 | 3 9 | 3 9 | 1 7 | 4 5 | 4 7 |
| 3 | 5 3 | 5 2 | 1 8 | 6 0 | 5 9 |
| 4 | 5 4 | 5 4 | 1 9 | 5 0 | 5 2 |
| 5 | 5 7 | 5 8 | 2 0 | 5 8 | 5 6 |
| 6 | 7 5 | 7 1 | 2 1 | 3 8 | 3 9 |
| 7 | 5 1 | 5 1 | 2 2 | 5 6 | 5 5 |
| 8 | 5 2 | 5 0 | 2 3 | 3 5 | 3 7 |
| 9 | 4 3 | 4 3 | 2 4 | 2 9 | 3 1 |
| 1 0 | 5 8 | 5 8 | 2 5 | 6 3 | 6 0 |
| 1 1 | 5 9 | 5 9 | 2 6 | 5 1 | 5 0 |
| 1 2 | 4 9 | 5 1 | 2 7 | 3 3 | 3 6 |
| 1 3 | 4 4 | 4 6 | 2 8 | 5 2 | 5 1 |
| 1 4 | 7 0 | 6 5 | 2 9 | 6 5 | 6 3 |
| 1 5 | 3 5 | 3 8 | 3 0 | 4 7 | 4 9 |

この結果より明らかなごとく、本発明方法はポリアニオン等を使用しないにもかかわらず、従来の沈殿法と極めて良好な相関を示していた。

実 施 例 2

実施例 1 の第 1 試薬のコレステロールデヒドロゲナーゼ、NAD およびりん酸緩衝液を 5 単位／m l のコレステロールオキシダーゼ（東洋紡）、5 単位／m l のパーオキシダーゼ（東洋紡製）および 1 0 0 m M M E S（p H 6）に代え、測定値を比較した。

（ 結 果 ）

結果を表 2 および図 2 に示す。

表 2

| 検体番号 | 沈 殿 法
(mg/dl) | 本発明法
(mg/dl) | 検体番号 | 沈 殿 法
(mg/dl) | 本発明法
(mg/dl) |
|------|------------------|-----------------|------|------------------|-----------------|
| 1 | 7 3 | 7 3 | 1 6 | 5 4 | 5 4 |
| 2 | 3 9 | 3 8 | 1 7 | 4 5 | 4 7 |
| 3 | 5 3 | 5 2 | 1 8 | 6 0 | 6 1 |
| 4 | 5 4 | 5 6 | 1 9 | 5 0 | 5 0 |
| 5 | 5 7 | 5 7 | 2 0 | 5 8 | 5 5 |
| 6 | 7 5 | 7 4 | 2 1 | 3 8 | 3 7 |
| 7 | 5 1 | 5 2 | 2 2 | 5 6 | 5 6 |
| 8 | 5 2 | 5 0 | 2 3 | 3 5 | 3 5 |
| 9 | 4 3 | 4 4 | 2 4 | 2 9 | 2 9 |
| 1 0 | 5 8 | 5 8 | 2 5 | 6 3 | 6 1 |
| 1 1 | 5 9 | 5 7 | 2 6 | 5 1 | 5 2 |
| 1 2 | 4 9 | 5 1 | 2 7 | 3 3 | 3 3 |
| 1 3 | 4 4 | 4 5 | 2 8 | 5 2 | 5 2 |
| 1 4 | 7 0 | 6 9 | 2 9 | 6 5 | 6 6 |
| 1 5 | 3 5 | 3 7 | 3 0 | 4 7 | 4 6 |

この結果より明らかなごとく、本発明方法はポリアニオン等を使用しないにもかかわらず、従来の沈殿法と極めて良好な相関を示していた。

2 0 実 施 例 3

実施例 1 及び実施例 2 の試薬を用い、中性脂肪レベルの異なる血清 5 検体を測定し、従来法と測定値を比較した。この結果を表 3 に示す。

表 3

| | 沈殿法の値
(mg/dl) | 実施例 1 の方
法の値 (mg/dl) | 実施例 2 の方
法の値 (mg/dl) | 中性脂肪の値
(mg/dl) |
|--------|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 5 検体 A | 4 7 | 4 9 | 4 9 | 1 9 8 |
| 検体 B | 4 9 | 5 0 | 4 9 | 3 0 1 |
| 検体 C | 2 6 | 2 7 | 2 4 | 7 4 2 |
| 検体 D | 6 0 | 6 1 | 6 1 | 5 1 7 |
| 検体 E | 3 7 | 4 0 | 3 6 | 4 2 8 |

- 1 0 表 3 に示すように、本発明によれば中性脂肪レベルが高い検体についても従来法と同レベルの測定値が得られた。

実 施 例 4

- 1 5 実施例 2 の第一試薬における 5 単位 / m l のコレステロールオキシダーゼを、下記表 4 の濃度、組合せになる組成に変えて、実施例 1 と同様の測定を行い、その測定値を沈殿法および実施例 2 の方法（基準試験系）と比較した。なお第二試薬は実施例 1 と同一のものを使用した。この結果を表 5 に示す。

（ 試験用試薬組成 ）

2 0

2 5

表 4

| 試験系 | 組 成 内 容 |
|-----|--|
| 5 | 基 準
コレステロールオキシダーゼ
(5 単位 / ml) |
| | A
コレステロールオキシダーゼ
(1 単位 / ml) |
| 1 0 | B
フルフェナム酸 + コレステロールオキシダーゼ
(0.15 mM) (1 単位 / ml) |
| | C
メフェナム酸 + コレステロールオキシダーゼ
(0.1 mM) (1 単位 / ml) |
| 1 5 | D
2, 2', 6', 2"-テル + コレステロールオキシダーゼ
ピリジン (0.5 mM) (1 単位 / ml) |
| | E
チグリン酸 + コレステロールオキシダーゼ
(50 mM) (1 単位 / ml) |
| | F
フシジン酸 + コレステロールオキシダーゼ
(0.1 mM) (1 単位 / ml) |
| 2 0 | G
酢酸ベータメタゾン + コレステロールオキシダーゼ
(0.2 mM) (1 単位 / ml) |
| | H
モネンシン + コレステロールオキシダーゼ
(0.2 mM) (1 単位 / ml) |
| 2 5 | I
メビノリン + コレステロールオキシダーゼ
(0.05 mM) (1 単位 / ml) |

(結 果)

表 5

| サンプル | 沈殿法
(mg/dl) | 試験系 (mg/dl) | | | | | | | | | |
|------|----------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 基準 | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| 1 | 80 | 77 | 72 | 77 | 68 | 76 | 74 | 74 | 74 | 74 | 76 |
| 2 | 76 | 74 | 72 | 74 | 64 | 73 | 71 | 73 | 74 | 74 | 73 |
| 3 | 75 | 72 | 70 | 72 | 66 | 71 | 70 | 70 | 70 | 71 | 71 |
| 4 | 71 | 72 | 71 | 70 | 66 | 69 | 69 | 71 | 69 | 71 | 72 |
| 5 | 71 | 70 | 70 | 69 | 61 | 68 | 67 | 68 | 70 | 69 | 70 |
| 6 | 71 | 70 | 67 | 70 | 63 | 68 | 68 | 67 | 69 | 70 | 68 |
| 7 | 69 | 66 | 63 | 66 | 61 | 65 | 65 | 65 | 64 | 65 | 66 |
| 8 | 67 | 69 | 70 | 68 | 60 | 68 | 67 | 66 | 69 | 68 | 68 |
| 9 | 66 | 65 | 65 | 65 | 59 | 65 | 64 | 63 | 65 | 65 | 65 |
| 10 | 65 | 65 | 64 | 65 | 58 | 65 | 64 | 62 | 64 | 65 | 63 |
| 11 | 57 | 58 | 56 | 57 | 54 | 57 | 56 | 57 | 57 | 58 | 57 |
| 12 | 56 | 56 | 55 | 55 | 49 | 55 | 54 | 53 | 55 | 55 | 55 |
| 13 | 54 | 55 | 54 | 55 | 50 | 54 | 53 | 53 | 53 | 54 | 54 |
| 14 | 53 | 54 | 54 | 52 | 46 | 53 | 52 | 52 | 54 | 52 | 53 |
| 15 | 52 | 53 | 52 | 51 | 47 | 52 | 51 | 49 | 52 | 51 | 52 |
| 16 | 51 | 53 | 51 | 50 | 46 | 50 | 51 | 49 | 51 | 51 | 51 |
| 17 | 49 | 50 | 48 | 48 | 44 | 47 | 48 | 47 | 48 | 48 | 49 |
| 18 | 47 | 48 | 48 | 46 | 41 | 46 | 46 | 45 | 47 | 47 | 47 |
| 19 | 45 | 46 | 48 | 44 | 38 | 46 | 43 | 45 | 47 | 47 | 46 |
| 20 | 47 | 47 | 49 | 45 | 40 | 46 | 45 | 45 | 48 | 47 | 47 |
| 21 | 42 | 44 | 44 | 43 | 39 | 43 | 42 | 41 | 43 | 44 | 43 |
| 22 | 39 | 42 | 43 | 41 | 37 | 41 | 41 | 39 | 41 | 41 | 41 |
| 23 | 32 | 35 | 36 | 33 | 31 | 36 | 34 | 32 | 34 | 34 | 33 |
| 24 | 18 | 20 | 22 | 19 | 17 | 23 | 19 | 18 | 21 | 20 | 19 |
| 25 | 40 | 42 | 42 | 41 | 38 | 45 | 41 | 40 | 41 | 42 | 41 |
| 相関係数 | | 0.996 | 0.990 | 0.998 | 0.992 | 0.995 | 0.997 | 0.997 | 0.994 | 0.995 | 0.997 |
| 傾き | | 0.905 | 0.838 | 0.941 | 0.832 | 0.856 | 0.888 | 0.915 | 0.877 | 0.891 | 0.917 |
| 切片 | | 5.6 | 8.7 | 2.6 | 3.4 | 7.5 | 4.6 | 2.8 | 6.3 | 5.7 | 4.1 |

5

1 0

1 5

2 0

2 5

この結果より、基準試験系（実施例 2）に比べコレステロールオキシダーゼを 1 / 5 に減らした場合（試験系 A）、相関係数は若干低くなり、切片の値も若干増加したが、反応促進物質を使用した場合は、コレステロールオキシダーゼが 1 / 5 であっても基準試験系とほぼ同様な結果が得られ、反応促進物質を用いることによりコレステロールオキシダーゼの使用量を減らすことができることが明らかとなった。

実施例 5

1.25 単位 / ml パーオキシダーゼ（東洋紡）、0.01% 4-アミノアンチピリン、0.02% ジスルホプロチルメタトルイジン、50mM NaCl を共通して含み、緩衝液の種類と pH、コレステロールオキシダーゼ（東洋紡）およびフルフェナム酸（シグマ）の濃度の異なる下記表 6 に記載の試薬（J ~ L）を調製した。

表 6

| | |
|-----|--|
| 試 薬 | ① 緩衝液 (pH)
② コレステロールオキシダーゼ濃度
③ フルフェナム酸濃度 |
| J | ① 50mM Bis-Tris (pH6.0)
② 0.5、1.0、2.5、5.0単位/ml
③ 0、0.01、0.05、0.1mM |
| K | ① 50mM PIPES (pH7.0)
② 0.5、1.0、2.5、5.0単位/ml
③ 0、0.1、0.5、1.0mM |
| L | ① 50mM MOPS (pH8.0)
② 0.5、1.0、2.5、5.0単位/ml
③ 0、1.0、5.0、10.0mM |

血清検体 3 μ l に、試薬 J ~ L を 300 μ l 添加し、37℃で5分間反応させた後、600nmにおける吸光度を測定した。以上の操作は、日立7150型自動分析機を用いて行った。

4例の血清検体を試薬 J ~ L で測定した。

試薬 J ~ L それぞれについて、5.0単位/ml コレステロールオキシダーゼ、0mM フルフェナム酸の試薬で得られた吸光度を100として、各コレステロールオキシダーゼ、フルフェナム酸濃度の試薬毎に相対吸光度を計算した。

(結 果)

4検体の相対吸光度を平均した結果を図3に示す。なお、図中でコレステロー

ルオキシダーゼはCODと表記した。

この結果、いずれのpHにおいても、フルフェナム酸の濃度依存的に相対吸光度が増加した。反応促進物質の使用により、コレステロールオキシダーゼの使用量を減らすことができることが確認された。

- 5 また、反応促進物質が、遊離型コレステロールを基質とする酵素を使用する遊離型コレステロールの測定法あるいは総コレステロールの測定法にも使用できることが明らかとなった。

1 0

1 5

2 0

2 5

請 求 の 範 囲

1. 試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、
リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させること
5 を特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法。

2. 試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、
リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素並びにフルフェナ
ム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、
1 0 酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質を
作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法。

3. 遊離型コレステロールを基質とする酵素が、コレステロールオキシダーゼ
またはコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項第1項または第2項記載の
1 5 前処理方法。

4. リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させ
た後、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリポ蛋白中に存在す
るコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白中のコレステロー
2 0 ル定量法。

5. リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素並びにフル
フェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシ
ジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促
2 5 進物質を作用させた後、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリ
ポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白
中のコレステロール定量法。

6. 遊離型コレステロールを基質とする酵素が、コレステロールオキシダーゼ

および／またはコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項第 4 項または第 5 項記載の定量法。

5 7. 特定のリポ蛋白が高比重リポ蛋白である請求項第 4 項ないし第 6 項の何れかの項記載の定量法。

8. 遊離型コレステロールを基質とする酵素を含み、リポ蛋白に作用する物質を実質的に含まないコレステロール測定用試料の前処理剤。

1 0 9. 遊離型コレステロールを基質とする酵素と、フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質とを含み、リポ蛋白に作用する物質を実質的に含まないコレステロール測定用試料の前処理剤。

1 5 1 0. 遊離型コレステロールを基質とする酵素を含み、コレステロールエステラーゼを実質的に含まないコレステロール測定用試料の前処理剤。

2 0 1 1. 遊離型コレステロールを基質とする酵素と、フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質とを含み、コレステロールエステラーゼを実質的に含まないコレステロール測定用試料の前処理剤。

2 5 1 2. 遊離型コレステロールを基質とする酵素がコレステロールデヒドロナーゼまたはコレステロールオキシダーゼである請求項第 8 項ないし第 1 0 項の何れかの項記載のコレステロール測定用試料の前処理剤。

1 3. 次の試薬、

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第2試薬
よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

5 14. 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、
- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

10

15. 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、
- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第2試薬

15

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

16. 次の試薬、

- (1) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第1試薬、

20

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質および発色剤を含む第2試薬
よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

17. 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼを含む第1試薬、

25

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬
よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

1 8. 次の試薬、

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼを含む第1試薬、

5 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

1 9. 次の試薬、

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第1試薬、

1 0 (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第3試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

2 0. 次の試薬、

1 5 (1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールエステラーゼを含む第3試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

2 0 2 1. 次の試薬、

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第3試薬

2 5 よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

2 2. 次の試薬、

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質を含む第1試薬、

- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

5 23. 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質を含む第1試薬、

- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第2試薬

1 0 よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

24. 次の試薬、

- (1) (a)コレステロールオキシダーゼ、(b)フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質および(c)過酸化水素消費物質を含む第1試薬、

1 5

- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

2 0

25. 次の試薬、

- (1) (a)コレステロールデヒドロゲナーゼ、(b)フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質および(c)補酵素を含む第1試薬、

2 5

- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

26. 次の試薬、

- 5 (1) (a) コレステロールオキシダーゼ、(b) フルフェナム酸、メフェナム酸、
2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータ
メタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質、(c)
(2) コレステロールエステラーゼおよび(d) 過酸化水素消費物質を含む第1
試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質および発色剤を含む第2 試薬
よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

10 27. 次の試薬、

- 15 (1) (a) コレステロールデヒドロゲナーゼ、(b) 補酵素、(c) フルフェナム酸
、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジ
ン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる
反応促進物質および(d) コレステロールエステラーゼを含む第1 試薬、
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2 試薬
よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

28. 次の試薬、

- 20 (1) (a) コレステロールデヒドロゲナーゼ、(b) 補酵素、(c) フルフェナム酸
、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジ
ン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる
反応促進物質および(d) コレステロールエステラーゼを含む第1 試薬、
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、パ
ーオキシダーゼおよび発色剤を含む第2 試薬
25 よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

29. 次の試薬、

- (1) (a) コレステロールオキシダーゼ、(b) フルフェナム酸、メフェナム酸、
2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータ

メタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質および(c)過酸化水素消費物質を含む第1試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第3試薬

5 よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

30. 次の試薬、

(1) (a) コレステロールデヒドロゲナーゼ、(b) フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質および(c) 補酵素を含む第1試薬、

10

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールエステラーゼを含む第3試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

15

31. 次の試薬、

(1) (a) コレステロールデヒドロゲナーゼ、(b) フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質および(c) 補酵素を含む第1試薬、

20

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第3試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

25

32. 次の試薬、

(1) (a) コレステロールデヒドロゲナーゼ、(b) 補酵素、(c) フルフェナム酸、メフェナム酸、2, 2', 6', 2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる

- 反応促進物質および(d)補酵素反応生成物消費物質を含む第1試薬、
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

5

33. 次の試薬、

- (1) (a)コレステロールデヒドロゲナーゼ、(b)補酵素、(c)フルフェナム酸、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる
1 0 反応促進物質および(d)補酵素反応生成物消費物質を含む第1試薬、
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

1 5

34. フルフェナム酸、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる遊離型コレステロールを基質とする酵素の反応促進物質。

2 0

35. 遊離型コレステロールを基質とする酵素が、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項第34項記載の反応促進物質。

2 5

36. 遊離型コレステロールを基質とする酵素並びにフルフェナム酸、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質を作用させることを特徴とする遊離型コレステロールの定量法。

37. 少なくとも、遊離型コレステロールを基質とする酵素並びにフルフェナム酸、メフェナム酸、2,2',6',2"-テルピリジン、チグリン酸、フシジン

酸、酢酸ベータメタゾン、モネンシンおよびメビノリンから選ばれる反応促進物質を作用させることを特徴とする総コレステロールの定量法。

5

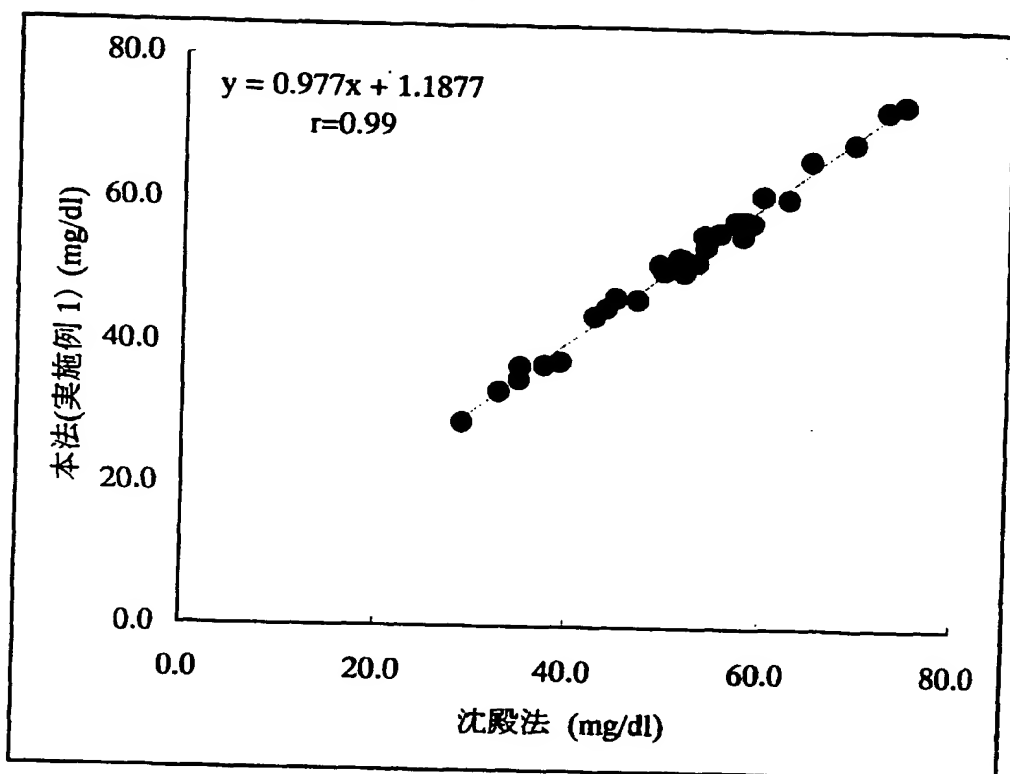
1 0

1 5

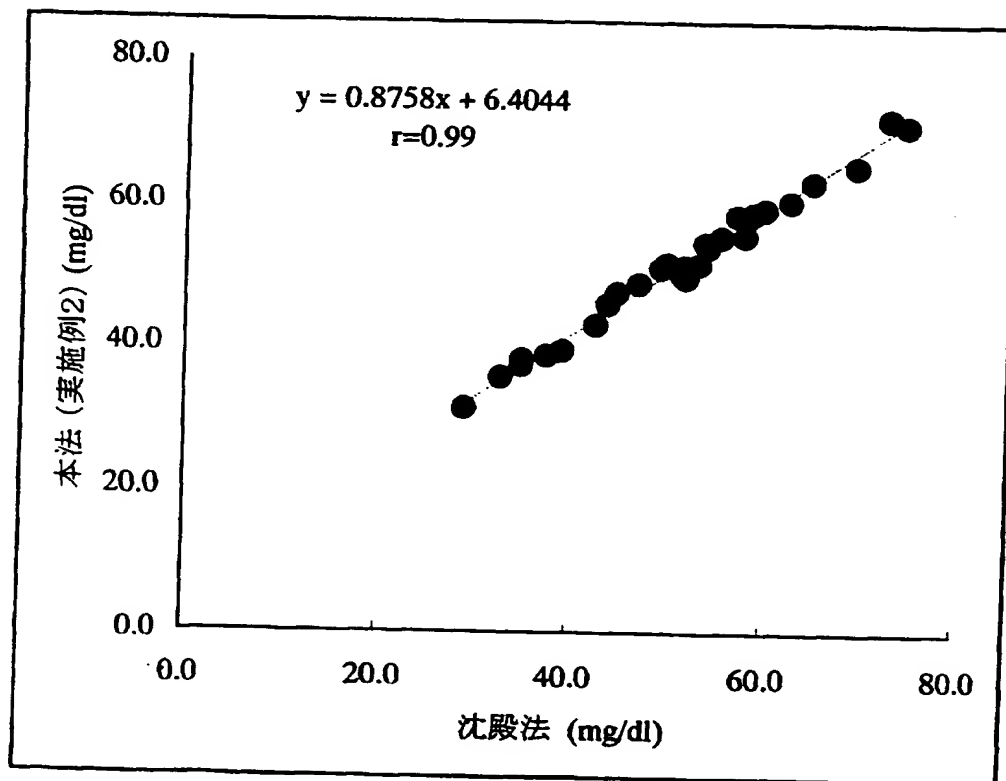
2 0

2 5

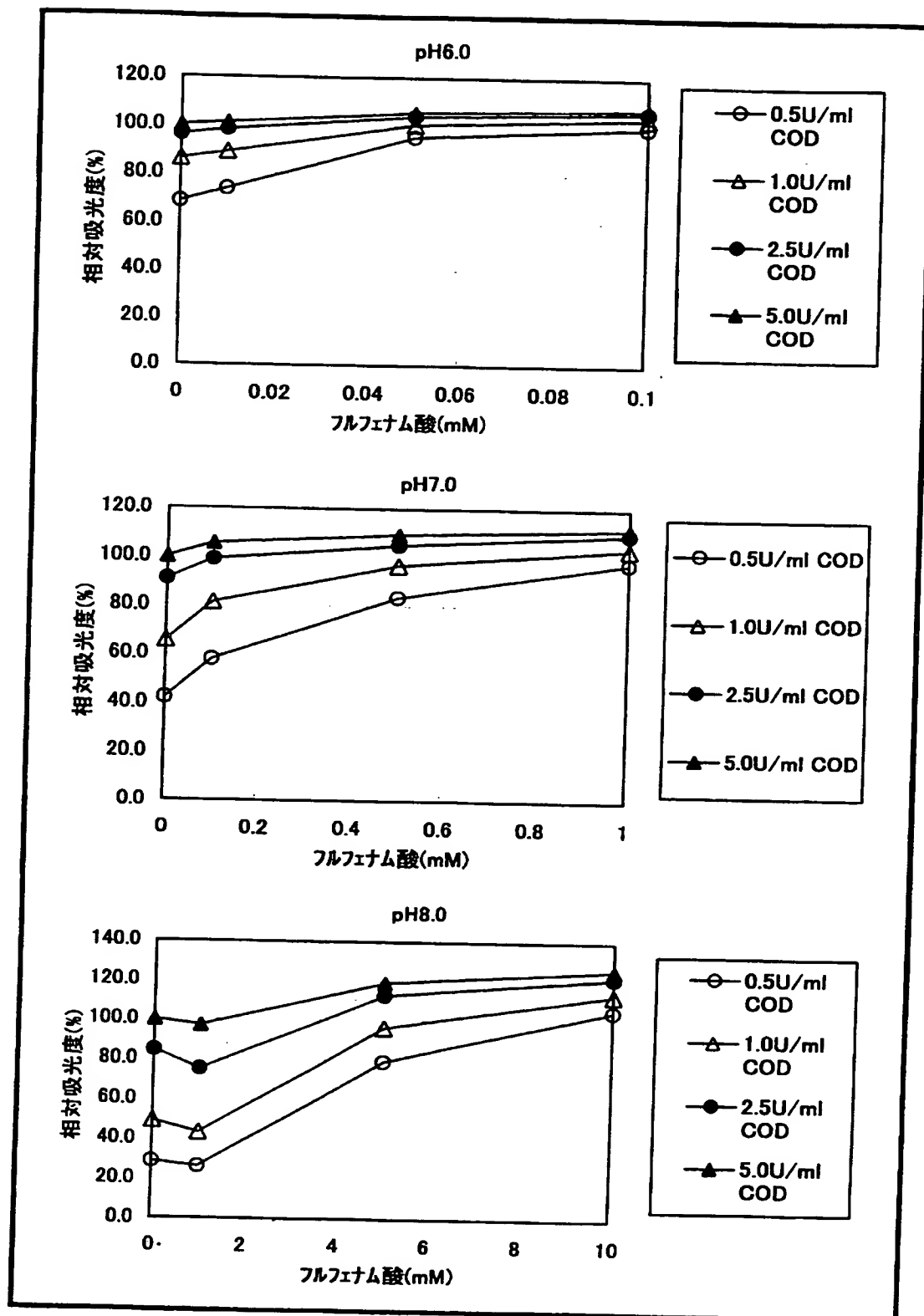
第 1 図



第 2 図



第 3 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/60, C12Q1/26, C12N9/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-C12Q1/60, C12N9/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG)

MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|----------------------------|
| Y | JP, 10-14596, A (TOYOBO CO., LTD.),
20 January, 1998 (20.01.98) (Family: none) | 1, 3, 4, 6-8,
10, 12-23 |
| Y | EP, 676642, A1 (INT REAGENTS CORP),
11 October, 1995 (11.10.95)
& JP, 7-280812, A | 1, 3, 4, 6-8,
10, 12-23 |
| A | Journal of Biologocal Chemistry(1995), Vol.270,
No.11, pp.5891-5900, Armand J.Mendez, "Monensin and
Brefeldin A Inhibit High Density Lipoprotein-mediated
Cholesterol Efflux from Cholesterol-enriched Cells" | 2, 5, 9, 11, 24-37 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 September, 2000 (12.09.00)Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



•

•

•



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12Q1/60, C12Q1/26, C12N9/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12Q1/00~C12Q1/60, C12N9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS (DIALOG)
 MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の
カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する
請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|-------------------------|
| Y | JP, 10-14596, A (東洋紡績株式会社) 20. 1月. 1998 (20. 01. 98) (ファミリーなし) | 1, 3, 4, 6-8, 10, 12-23 |
| Y | EP, 676642, A1 (INT REAGENTS CORP) 11. 10月. 1995 (11. 10. 95) & JP, 7-280812, A | 1, 3, 4, 6-8, 10, 12-23 |
| A | Journal of Biologocal Chemistry, (1995) Vol. 270, No. 11, p. 5891-5900, Armand J. Mendez Monensin and Brefeldin A Inhibit High Density Lipoprotein-mediated Cholesterol Efflux from Cholesterol-enriched Cells | 2, 5, 9, 11, 24-37 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 09. 00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

8114

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



8

9

10

11

12

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|--------------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人
の書類記号 PF-000006-WO | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号
PCT/JPO0/03860 | 国際出願日
(日.月.年) 14.06.00 | 優先日
(日.月.年) 21.06.99 |
| 出願人(氏名又は名称)
第一化学薬品株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/60, C12Q1/26, C12N9/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00~C12Q1/60, C12N9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の
カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する
請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|-------------------------|
| Y | JP, 10-14596, A (東洋紡績株式会社) 20. 1月. 1998 (20. 01. 98) (ファミリーなし) | 1, 3, 4, 6-8, 10, 12-23 |
| Y | EP, 676642, A1 (INT REAGENTS CORP) 11. 10月. 1995 (11. 10. 95) & JP, 7-280812, A | 1, 3, 4, 6-8, 10, 12-23 |
| A | Journal of Biologocal Chemistry, (1995) Vol. 270, No. 11, p. 5891-5900, Armand J. Mendez "Monensin and Brefeldin A Inhibit High Density Lipoprotein-mediated Cholesterol Efflux from Cholesterol-enriched Cells" | 2, 5, 9, 11, 24-37. |

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 09. 00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

above-described problem reported in "SEIBUTSU SHIRYO BUNSEKI (ANALYSIS OF BIOLOGICAL SAMPLES)", that is, the problem that a value of cholesterol in the specific lipoprotein fraction as quantitated by using a substance which acts only upon a specific lipoprotein such as HDL becomes higher than the corresponding value as determined by the precipitation method; and came to a conclusion that even from non-HDL lipoproteins (LDL, VLDL and the like) the cholesterol of which is not supposed to be measured, a small amount of free cholesterol existing on their surfaces or in the vicinity of their surfaces is liberated to cause a positive error. Based on this finding, it has been found that a cholesterol value obtained by a quantitation method making use of a substance, which acts upon a specific lipoprotein only, becomes consistent with the corresponding value obtained by the precipitation method when the cholesterol value is measured after consuming only free cholesterol in advance under conditions that lipoproteins remain substantially unchanged, leading to the completion of the present invention.

Described specifically, the present invention provides a method for pretreating a sample, which contains various lipoproteins, prior to measuring cholesterol existing in specific one of the lipoproteins in the sample, which comprises causing an enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate, to act upon the sample.

The present invention also provides a method for

quantitating cholesterol existing in a specific lipoprotein in a sample, which comprises causing an enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate, to act upon the sample with the lipoprotein contained therein; and then measuring the cholesterol, which exists in the specific lipoprotein, by using a substance which acts upon the specific lipoprotein only.

Brief Description of the Figures

FIG. 1 is a diagram showing a correlation between the present invention in Example 1 and the precipitation method;

FIG. 2 is a diagram showing a correlation between the present invention in Example 2 and the precipitation method; and

FIG. 3 is a diagram showing effects of a reaction accelerator in Example 5.

Best Modes for Carrying Out the Invention

In the present invention, before measuring cholesterol existing in a specific lipoprotein in a sample, an enzyme which acts upon free cholesterol as a substrate is caused to act, as pretreatment, upon the sample such that the free cholesterol is consumed.

As the enzyme which acts upon free cholesterol as a substrate, any enzyme can be used insofar as it acts upon free cholesterol as a substrate. Illustrative are cholesterol dehydrogenase and cholesterol oxidase. They can be of any

Claims:

1. A method for pretreating a sample, which contains various lipoproteins, prior to measuring cholesterol existing in specific one of said lipoproteins in said sample, which comprises causing an enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate, to act upon said sample.
2. A method for pretreating a sample, which contains various lipoproteins, prior to measuring cholesterol existing in specific one of said lipoproteins in said sample, which comprises causing an enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate, and a reaction accelerator, which is selected from flufenamic acid, mefenamic acid, 2,2',6',2"-terpyridine, tiglic acid, fusidic acid, betamethasone acetate, monensin or mevinolin, to act upon said sample.
3. A pretreatment method according to claim 1 or 2, wherein said enzyme is cholesterol oxidase or cholesterol dehydrogenase.
4. A method for quantitating cholesterol existing in a specific lipoprotein in a sample, which comprises causing an enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate, to act upon said sample with said lipoprotein contained therein; and then measuring said cholesterol, which exists in said specific lipoprotein, by using a substance which acts upon said specific lipoprotein only.
5. A method for quantitating cholesterol existing in a specific lipoprotein in a sample, which comprises causing an



enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate,, and a reaction accelerator, which is selected from flufenamic acid, mefenamic acid, 2,2',6',2"-terpyridine, tiglic acid, fusidic acid, betamethasone acetate, monensin or mevinolin, to act upon said sample with said lipoprotein contained therein; and then measuring said cholesterol, which exists in said specific lipoprotein, by using a substance which acts upon said specific lipoprotein only.

6. A quantitation method according to claim 4 or 5, wherein said enzyme is cholesterol oxidase and/or cholesterol dehydrogenase.

7. A quantitation method according to any one of claims 4-6, wherein said specific lipoprotein is high density lipoprotein.

8. A pretreatment agent for a sample to be measured for cholesterol, comprising an enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate, and substantially no substance which acts upon lipoprotein.

9. A pretreatment agent for a sample to be measured for cholesterol, comprising an enzyme, which acts upon free cholesterol as a substrate, a reaction accelerator which is selected from flufenamic acid, mefenamic acid, 2,2',6',2"-terpyridine, tiglic acid, fusidic acid, betamethasone acetate, monensin or mevinolin, and substantially no substance which acts upon lipoprotein.

10. A pretreatment agent for a sample to be measured for



1111

1111